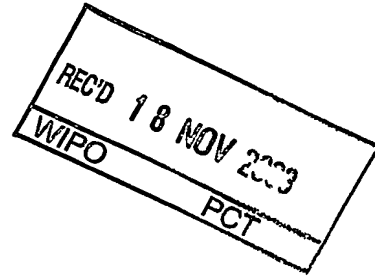


9 MAR 2005

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 102 51 184.5

**Anmeldetag:** 04. November 2002

**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, Düsseldorf/DE

**Bezeichnung:** Mutanten zur Herstellung von D-Aminosäuren

**IPC:** C 12 N 1/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 19. August 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Hintermeier

### Mutanten zur Herstellung von D-Aminosäuren

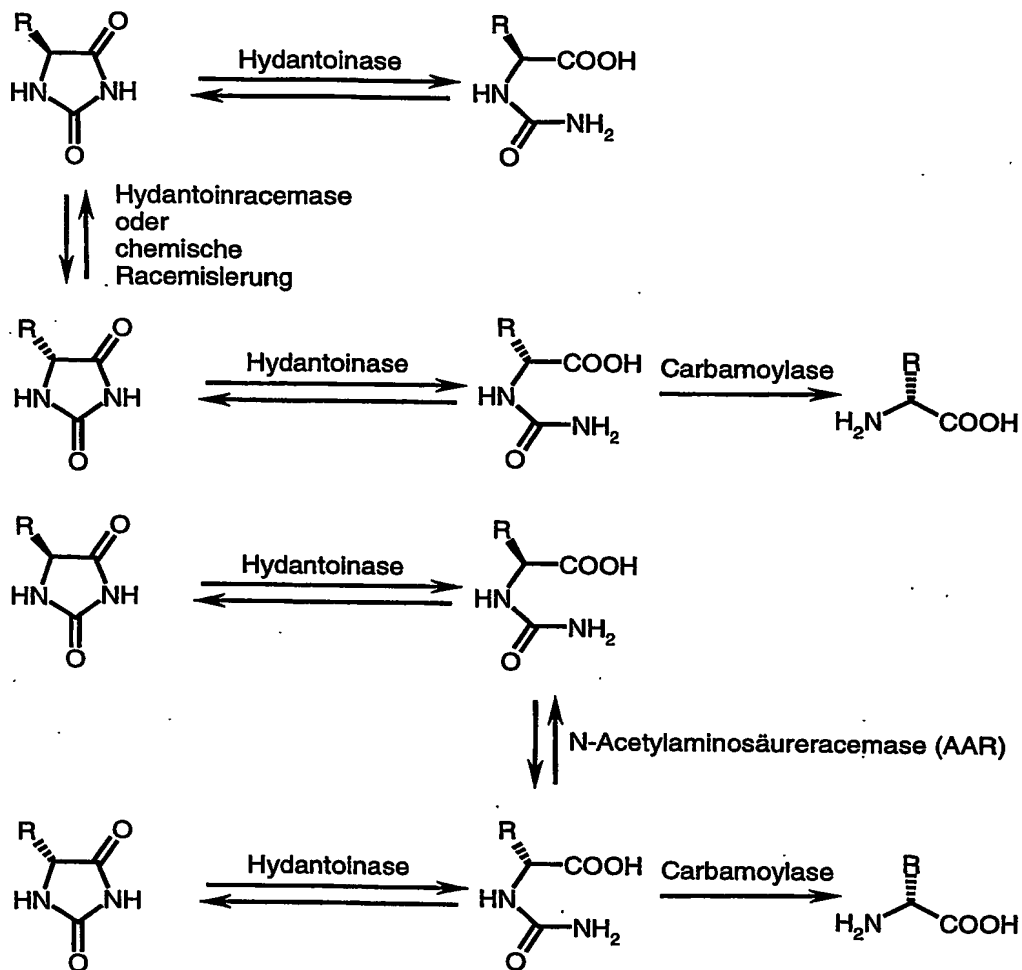
Die vorliegende Erfindung ist auf ein Verfahren zur Herstellung von D-Aminosäuren gerichtet. Insbesondere werden diese enzymatisch über die sogenannte

5 Hydantoinaseroute unter Verwendung von rekombinanten Mikroorganismen gewonnen. Gleichfalls behandelt die vorliegende Erfindung derart modifizierte Mikroorganismen.

D-Aminosäuren sind in der organischen Synthese als Intermediate zur Herstellung von pharmazeutischen  
10 Wirkstoffen häufig eingesetzte Verbindungen.

Die enzymatische Hydrolyse von 5-substituierten Hydantoinen zu N-Carbamoyl-aminosäuren und deren Weiterreaktion zu den entsprechenden enantiomerenangereicherten Aminosäuren ist eine Standardmethode in der organischen Chemie ("Enzyme  
15 Catalysis in Organic Synthesis", Eds.: Drauz, Waldmann, VCH, 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> Ed.). Die Enantiodifferenzierung kann dabei entweder auf der Stufe der Hydantoinhydrolyse durch Hydantoinasen erfolgen oder aber wahlweise bei der Spaltung der N-Carbamoyl-aminosäuren mittels enantioselektiver  
20 Carbamoylasen. Da die Enzyme nur jeweils eine optische Antipode der entsprechenden Verbindung umsetzen, wird versucht, die andere im Gemisch (in-situ) zu razemisieren, um den vollständigen Umsatz des razemischen leicht herstellbaren Hydantoins in die korrespondierende  
25 enantiomerenangereicherte Aminosäure zu gewährleisten. Die Razemisierung kann dabei entweder auf der Stufe der Hydantoine mittels chemischer (Base, Säure, erhöhte Temp.) oder enzymatischer Verfahren erfolgen oder aber auf der Stufe der N-Carbamoylaminosäuren mittels z.B.  
30 Acetylaminosäurerazemasen (DE10050124) vonstatten gehen. Letztere Variante funktioniert erfolgreich naturgemäß nur bei Einsatz von enantioselektiven Carbamoylasen. Das nachfolgende Schema veranschaulicht diesen Sachverhalt.

Schema 1:



5

Es hat sich herausgestellt, dass die Verwendung rekombinanter Mikroorganismen, welche Hydantoinase-, Carbamoylase- und Razemaseaktivitäten besitzen, zur Herstellung unterschiedlicher D-Aminosäuren problematisch sind. In Fig. 1 wird die Umsetzung von Hydroxymethylhydantoin und Ethylhydantoin mit *E.coli* JM109 transformiert mit einer D-Carbamoylase und D-Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 (gem. Patentanmeldung DE10114999.9 und DE10130169.3) aufgezeigt. Die Reaktionsbedingungen sind entsprechend Beispiel 1

gewählt.

Wie Fig. 1 beispielhaft zeigt, erfolgt bei der Umsetzung unterschiedlicher 5-monosubstituierter Hydantoine ein starker Abbau der gebildeten D-Aminosäuren. Dies reduziert  
5 die erreichbare Ausbeute und erschwert die Produktaufarbeitung.

Dem Fachmann ist bekannt, dass am Abbau von D-Aminosäuren unterschiedliche Enzyme wie D-Aminosäureoxidasen [EC 1.4.3.3], D-Aminosäuredehydrogenasen [EC 1.4.99.1], D-  
10 Aminosäureaminotransferasen [EC 2.6.1.21], D-Aminosäure-N-acetyltransferasen [EC 2.3.1.36], D-Hydroxyaminosäuredehydratasen [EC 4.2.1.14] und D-Aminosäurerazemasen [EC 5.1.1.10] beteiligt sein können. Ebenso sind dem Fachmann unterschiedliche Methoden bekannt,  
15 um diese Gene gezielt oder auch ungezielt zu inaktivieren [The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of Gram-negative bacteria. Alexeyev, Mikhail F. BioTechniques (1999), 26(5), 824-828; One-step  
20 inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products, Datsenko, Kirill A. and Wanner, Barry L. PNAS (2000), 97(12), 6640-6645; D-amino acid dehydrogenase of Escherichia coli K12: positive selection of mutants defective in enzyme activity and localization of the structural gene, Wild, Jadwiga and Klopotoski, T. Mol.Gen.Genet. (1981), 181(3), 373-378.].  
25

Leider unbekannt und unvorhersagbar ist jedoch der zu erwartende Effekt auf das Zellwachstum beim Inaktivieren der unterschiedlichen Enzyme. Ebenso kann nicht  
30 vorhergesagt werden, welches Enzym oder ob eine Kombination von unterschiedlichen Enzymen inaktiviert werden muss, um den Abbau einer bestimmten D-Aminosäure im gewünschten Ausmaß zu reduzieren.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher, einen  
35 Mikroorganismus bereitzustellen, der zur Produktion von D-

Aminosäuren über die Carbamoylase-/Hydantoinaseroute befähigt ist und der eine höhere Ausbeute an produzierter D-Aminosäure ermöglichen hilft. Dieser sollte im technischen Maßstab unter ökonomischen wie ökologischen Gesichtspunkten vorteilhaft einsetzbar sein. Insbesondere sollte er ein sehr gutes Wachstumsverhalten unter normalen wirtschaftlich sinnvollen Bedingungen, sowie hinreichende genetische und physikalische Stabilität und eine hinreichend schnelle Umsetzungsgeschwindigkeit für Hydantoine besitzen.

Diese Aufgabe wird anspruchsgemäß gelöst. Ansprüche 1 bis 5 beziehen sich auf bestimmte derart modifizierte Mikroorganismen, während Ansprüche 6 und 7 ein Verfahren zur Herstellung von D-Aminosäuren schützt.

Dadurch, dass man einen rekombinanten Mikroorganismus zur Herstellung von D-Aminosäuren ausgehend von N-Carbamoylaminosäuren oder 5-monosubstituierten Hydantoinen bereitstellt, bei dem durch Mutagenese das Gen kodierend für eine D-Aminosäureoxidase und/oder das Gen kodierend für eine D-Serindehydratase inaktiviert ist, gelangt man überraschend und dennoch vorteilhaft zur Lösung der genannten Aufgaben. Insbesondere ist es als überraschend zu werten, dass rekombinant hergestellte Mikroorganismen mit dem erfindungsgemäßen Genprofil tatsächlich stabil sind und D-Aminosäuren in für industrielle Größenordnungen ausreichendem Maße zu produzieren im Stande sind.

Als Mikroorganismen für rekombinante Ausführungsformen können im Prinzip alle dem Fachmann für diesen Zweck in Frage kommende Organismen wie Pilze z.B. *Aspergillus* sp., *Streptomyces* sp., *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, oder auch Prokaryonten, wie *E. coli*, *Bacillus* sp. herangezogen werden.

Als bevorzugte erfindungsgemäße Mikroorganismen können solche der Gattung *Escherichia coli* angesehen werden. Ganz besonders bevorzugt sind: *E. coli* XL1 Blue, NM 522, JM101,

JM109, JM105, BL21, W3110, RR1, DH5 $\alpha$ , TOP 10<sup>-</sup> oder HB101. Die Herstellung derart modifizierter Organismen kann nach dem Fachmann geläufigen Methoden erfolgen. Dieser dient zur Vermehrung und Gewinnung einer ausreichenden Menge der rekombinanten Enzyme. Die Verfahren hierfür sind dem Fachmann wohlbekannt (Sambrook, J.; Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989), Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).

Die besagten Nukleinsäuresequenzen werden also nach bekannten Methoden mit Plasmiden oder Vektoren in einen Wirtsorganismus kloniert und die so exprimierten Polypeptide können mit geeigneten Screening-Methoden detektiert werden. Zur Detektion sind grundlegend alle möglichen Nachweisreaktionen für die gebildeten Moleküle geeignet. Insbesondere eignen sich grundlegend alle möglichen Nachweisreaktionen für Ammoniak bzw. Ammoniumionen wie Nessler-Reagenz (Vogel, A., I., (1989) Vogel's textbook of quantitative chemical analysis, John Wiley & Sons, Inc., 5<sup>th</sup> ed., 679-698, New York) die Indophenolreaktion auch Berthelot'sche Reaktion genannt (Wagner, R., (1969) Neue Aspekte zur Stickstoffanalytik in der Wasserchemie, Vom Wasser, VCH-Verlag, Bd. 36, 263-318, Weinheim) insbesondere die enzymatische Bestimmung mittels der Glutamat-Dehydrogenase (Bergmeyer, H., U., und Beutler, H.-O. (1985) Ammonia, in: Methods of Enzymatic Analysis, VCH-Verlag, 3<sup>rd</sup> Edition, Vol. 8: 454-461, Weinheim) aber auch der Nachweis mit Ammonium-sensitiven Elektroden. Weiterhin dienen HPLC-Methoden zum Nachweis von Aminosäuren wie z.B. ein Derivat-Verfahren auf der Basis von o-Phthaldialdehyd und N-Isobutyryl-Cystein zur Enantiomerentrennung von Aminosäuren (Brückner, H., Wittner R., und Godel H., (1991) Fully automated high-performance liquid chromatographic separation of DL-amino acids derivatized with o-Phthaldialdehyde together with N-isopropyl-cysteine. Application to food samples, Anal. Biochem. 144, 204-206).

- Als Plasmide oder Vektoren kommen im Prinzip alle dem Fachmann für diesen Zweck zur Verfügung stehenden Ausführungsformen in Frage. Derartige Plasmide und Vektoren können z. B. von Studier und Mitarbeiter (Studier, W. F.; Rosenberg A. H.; Dunn J. J.; Dubendorff J. W.; (1990), Use of the T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, Methods Enzymol. 185, 61-89) oder den Broschüren der Firmen Novagen, Promega, New England Biolabs, Clontech oder Gibco BRL entnommen werden. Weiter bevorzugte Plasmide und Vektoren können gefunden werden in: Glover, D. M. (1985), DNA cloning: a practical approach, Vol. I-III, IRL Press Ltd., Oxford; Rodriguez, R.L. und Denhardt, D. T (eds) (1988), Vectors: a survey of molecular cloning vectors and their uses, 179-204, Butterworth, Stoneham; Goeddel, D. V. (1990), Systems for heterologous gene expression, Methods Enzymol. 185, 3-7; Sambrook, J.; Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989), Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 20 Besonders bevorzugte Klonierungsvektoren von D-Carbamoylasen in *E.coli* sind beispielsweise Derivate von pBR322, pACYC184, pUC18 oder pSC101, welche konstitutive als auch induzierbare Promotoren zur Expressionskontrolle tragen können. Besonders bevorzugte Promotoren sind lac, tac, trp, trc, T3, T5, T7, rhaBAD, araBAD,  $\lambda$ pL und phoA-Promotoren, welche dem Fachmann hinlänglich bekannt sind [Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*, Makrides S.C. Microbiol.Rev. 60(3), 512-538].
- 30 Die Inaktivierung der D-Aminosäureoxidase (dadA) bzw. der D-Serindehydratase (dsdA) dieser Organismen erfolgt dabei nach dem Fachmann bekannten eingangs beschriebenen Methoden. Zur Erzeugung der rekombinanten Ausführungsarten der D-Serindehydratase bzw. D-Aminosäureoxidase defizienten
- 35 Stämme mit D-Carbamoylaseaktivität sind dem Fachmann die grundlegenden molekularbiologischen Methoden also bekannt (Sambrook, J.; Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989),

Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). Ebenso sind Gensequenzen unterschiedlicher D-Carbamoylasen z.B. aus *Agrobacterium* sp., *Arthrobacter* sp. oder *Bacillus* sp. und *Ralstonia pickettii* bekannt, die bevorzugt verwendet werden (u.a. aus US 5858759, US 5807710, US 6083752, US 6083752, US 6083752, US 6083752, US 6083752).

Für die Herstellung der Organismen, welche zusätzlich eine Hydantoinase und ggf. eine Hydantoin- oder Carbamoylracemase aufweisen, können gleiche Methoden angewandt werden. Als Hydantoinasen sind dabei bevorzugt solche aus *Thermus* sp., *Bacillus* sp., *Mycobacterium* sp., *Corynebacterium* sp., *Agrobacterium* sp., *E.coli*, *Burkholderia* sp., *Pseudomonas* sp., oder *Arthrobacter* sp. einzusetzen. Hydantoinrazemase können bevorzugt aus *Pseudomonas* sp., *Arthrobacter* sp., oder *Agrobacterium* sp., ggf. unter Zugabe von Hilfsstoffen, wie Metallionen, beispielsweise  $Mn^{2+}$ -Ionen angewandt werden.

So konnten die erfolgreichen Mutanten *Escherichia coli* DSM 15181 und *Escherichia coli* DSM 15182 hergestellt werden. Diese bilden daher zusammen mit den aus ihnen ableitbaren weiteren Mutanten einen nächsten Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Im gleichfalls erfindungsgemäßen Verfahren wird z.B. ein Hydantoin in einem geeigneten Lösungsmittel, wie beispielsweise Wasser, welches mit weiteren wasserlöslichen oder nicht wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln versetzt sein kann, bei pH-Werten zwischen 6,0 und 11, bevorzugt zwischen 7 und 10, und einer Temperatur zwischen 10°C und 100°C, bevorzugt zwischen 30°C und 70°C, besonders bevorzugt zwischen 37°C und 60°C mit den besagten Zellen oder Zellbestandteilen umgesetzt. Für die Anwendung können die betrachteten Enzyme auch in freier Form verwendet werden. Weiterhin können die Enzyme auch als Bestandteil eines intakten Gastorganismus eingesetzt werden oder in Verbindung mit der aufgeschlossenen und beliebig hoch



aufgereinigten Zellmasse des Wirtsorganismus.

Möglich ist ebenfalls die Verwendung der rekombinanten Zellen in geflockter, quervernetzter oder immobilisierter Form, beispielsweise unter Verwendung von Agar, Agarose, Carrageenan, Alginate, Pectine, Chitosan, Polyacrylamide und andere synthetische Träger (Chemical aspects of immobilized systems in biotechnologies. Navratil, Marian; Sturdik, Ernest. Chemicke Listy (2000), 94(6), 380-388; Industrial applications of immobilized biocatalysts and biomaterials. Chibata, Ichiro. Advances in Molecular and Cell Biology (1996), 15A(Biochemical Technology), 151-160; Immobilization of genetically engineered cells: a new strategy for higher stability. Kumar, P. K. R.; Schuegerl, K. Journal of Biotechnology (1990), 14(3-4), 255-72.)).

Demgemäß bildet einen nächsten Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von D-Aminosäuren mit einem erfindungsgemäßen Mikroorganismus. Vorzugsweise werden D-Aminobuttersäure, D-Serin, D-Methionin, D-Tryptophan und D-Phenylalanin hergestellt.

Bei diesem Verfahren zur Herstellung von D-Aminosäuren werden bevorzugt Organismen mit D-carbamoylaseaktiven und hydantoinaseaktiven und dadA und/oder dsdA inaktivierten Zellen verwendet. Hierbei ist zu erwähnen, dass als Edukt sowohl L-, D- oder DL-Carbamoylaminosäuren als auch 5-monosubstituierte Hydantoine in Frage kommen, welche über hinlänglich bekannte Hydantoinasen in die entsprechenden Carbamoylaminosäuren überführt werden können ("Enzyme Catalysis in Organic Synthesis", Eds.: Drauz, Waldmann, VCH, 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> Ed.). Die verwendeten dadA und/oder dsdA defizienten Stämme können dabei die Carbamoylase und Hydantoinase, gegebenenfalls auch eine Hydantoinrazemase oder Carbamoylaminosäurerazemase koexprimieren und sowohl in freier oder auch immobilisierter Form eingesetzt werden (s.o.).

Wie sich nun gezeigt hat, ist die Inaktivierung unterschiedlicher Enzyme erforderlich, um für

unterschiedliche D-Aminosäuren den Abbau in ausreichendem Maße ( $< 10\%$  Abbau innerhalb von  $>10$  Stunden) zu reduzieren (siehe Fig. 2). Für den Abbau von D-Serin zeigte sich überraschenderweise, dass die Inaktivierung des Gens der D-Aminosäureoxidase (*dadA*) nicht ausreicht, um deren Abbau effektiv zu reduzieren. Für eine effektive Reduzierung des Abbaus dieser Aminosäure musste zusätzlich die D-Serindehydratase inaktiviert werden. In der Literatur war im Gegensatz dazu berichtet worden, dass durch eine Inaktivierung von *dadA* ein  $> 3$  fach reduzierter Abbau von D-Serin erreicht wird [D-Amino acid dehydrogenase of *Escherichia coli* K12: positive selection of mutants defective in enzyme activity and localization of the structural gene. Wild, J.; Klotkowski, T. Mol. Gen. Genet. (1981), 181(3), 373-378]. Ebenfalls im Gegensatz zu den dort beschriebenen Ergebnissen, zeigte sich überraschenderweise, dass D-Serin sehr viel schneller abgebaut wird als beispielsweise D-Methionin.

Der Abbau aromatischer und aliphatischer D-Aminosäuren, wie beispielsweise D-Phenylalanin, D-Methionin oder D-Aminobuttersäure, wird im Gegensatz zu D-Serin ausreichend durch eine Inaktivierung der D-Aminosäureoxidase erreicht. Für D-Phenylalanin zeigen jedoch überraschenderweise beide Deletionen ( $\Delta dsdA$  &  $\Delta dadA$ ) einen positiven Effekt, wohingegen für D-Methionin die Deletion in *dsdA* keinen zusätzlichen Effekt zeigt. Diese Ergebnisse sind in Fig. 2 zusammengefasst (Abbau unterschiedlicher Aminosäuren mit unterschiedlichen Mutanten von *E. coli* BW25113. *E. coli* ET3 besitzt eine Deletion der D-Aminosäureoxidase ( $\Delta dadA$ ); *E. coli* ET4 besitzt zusätzlich eine Deletion der D-Serindehydratase ( $\Delta dsdA$ ). Reaktionsbedingungen siehe Beispiel 3).

Die in dieser Schrift genannten Literaturstellen gelten als von der Offenbarung mitumfasst.

Die Organismen DSM15181 (ET3) und DSM15182 (ET4) wurden durch die Degussa AG am 10.09.2002 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig hinterlegt.

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa AG

5 &lt;120&gt; Mutanten zur Herstellung von D-Aminosäuren

&lt;130&gt; 020453 AM

&lt;140&gt;

10 &lt;141&gt;

&lt;160&gt; 8

15 &lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 948

&lt;212&gt; DNA

20 &lt;213&gt; Arthrobacter crystallopoietes

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(948)

25 &lt;400&gt; 1

atg gcg aaa aac ttg atg ctc gcg gtc gct caa gtc ggc ggt atc gat	48
Met Ala Lys Asn Leu Met Leu Ala Val Ala Gln Val Gly Gly Ile Asp	
1 5 10 15	

30 agt tcg gaa tca aga ccc gaa gtc gtc gcc cgc ttg att gcc ctg ctg	96
Ser Ser Glu Ser Arg Pro Glu Val Val Ala Arg Leu Ile Ala Leu Leu	
20 25 30	

35 gaa gaa gca gct tcc cag ggc gcg gaa ctg gtg gtc ttt ccc gaa ctc	144
Glu Glu Ala Ala Ser Gln Gly Ala Glu Leu Val Val Phe Pro Glu Leu	
35 40 45	

40 acg ctg acc acg ttc ttc ccg cgt acc tgg ttc gaa gaa ggc gac ttc	192
Thr Leu Thr Thr Phe Phe Pro Arg Thr Trp Phe Glu Glu Gly Asp Phe	
50 55 60	

45 gag gaa tac ttc gat aaa tcc atg ccc aat gac gac gtc gcg ccc ctt	240
Glu Glu Tyr Phe Asp Lys Ser Met Pro Asn Asp Asp Val Ala Pro Leu	
65 70 75 80	

50 ttc gaa cgc gcc aaa gac ctt ggc gtg ggc ttc tac ctc gga tac gcg	288
Phe Glu Arg Ala Lys Asp Leu Gly Val Gly Phe Tyr Leu Gly Tyr Ala	
85 90 95	

50 gaa ctg acc agt gat gag aag cgg tac aac aca tca att ctg gtg aac	336
Glu Leu Thr Ser Asp Glu Lys Arg Tyr Asn Thr Ser Ile Leu Val Asn	
100 105 110	

55 aag cac ggc gac atc gtc ggc aag tac cgc aag atg cat ctg ccg ggc	384
Lys His Gly Asp Ile Val Gly Lys Tyr Arg Lys Met His Leu Pro Gly	
115 120 125	

cac gcc gat aac cgg gaa gga cta ccc aac cag cac ctt gaa aag aaa	432
His Ala Asp Asn Arg Glu Gly Leu Pro Asn Gln His Leu Glu Lys Lys	

	130	135	140	
5	tac ttc cgc gaa gga gat ctc gga ttc ggt gtc ttc gac ttc cac ggc Tyr Phe Arg Glu Gly Asp Leu Gly Phe Gly Val Phe Asp Phe His Gly 145 150 155 160	480		
10	gtg cag gtc gga atg tgt ctc tgc aac gac cgg cga tgg ccg gag gtc Val Gln Val Gly Met Cys Leu Cys Asn Asp Arg Arg Trp Pro Glu Val 165 170 175	528		
15	tac cgc tct ttg gcc ctg cag gga gca gag ctc gtc gtc ctg ggc tac Tyr Arg Ser Leu Ala Leu Gln Gly Ala Glu Leu Val Val Leu Gly Tyr 180 185 190	576		
20	aac acc ccc gat ttc gtt ccc ggc tgg cag gaa gag cct cac gcg aag Asn Thr Pro Asp Phe Val Pro Gly Trp Gln Glu Glu Pro His Ala Lys 195 200 205	624		
25	atg ttc acg cac ctt ctt tca ctt cag gca ggg gca tac cag aac tcg Met Phe Thr His Leu Leu Ser Leu Gln Ala Gly Ala Tyr Gln Asn Ser 210 215 220	672		
30	gta ttt gtg gcg gct gcc ggc aag tcg ggc ttc gaa gac ggg cac cac Val Phe Val Ala Ala Ala Gly Lys Ser Gly Phe Glu Asp Gly His His 225 230 235 240	720		
35	atg atc ggc gga tca gcg gtc gcc gcg ccc agc ggc gaa atc ctg gca Met Ile Gly Gly Ser Ala Val Ala Ala Pro Ser Gly Glu Ile Leu Ala 245 250 255	768		
40	aaa gca gcc ggc gag ggc gat gaa gtc gtc gtt gtg aaa gca gac atc Lys Ala Ala Gly Glu Gly Asp Glu Val Val Val Val Lys Ala Asp Ile 260 265 270	816		
45	gac atg ggc aag ccc tat aag gaa agc gtc ttc gac ttc gcc gcc cat Asp Met Gly Lys Pro Tyr Lys Glu Ser Val Phe Asp Phe Ala Ala His 275 280 285	864		
50	cgg cgc ccc gac gca tac ggc atc atc gcc gaa agg aaa ggg cgg ggc Arg Arg Pro Asp Ala Tyr Gly Ile Ile Ala Glu Arg Lys Gly Arg Gly 290 295 300	912		
55	gcc cca ctg ccc gtc ccg ttc aac gtg aat gac taa Ala Pro Leu Pro Val Pro Phe Asn Val Asn Asp 305 310 315	948		
	<210> 2			
	<211> 316			
	<212> PRT			
	<213> Arthrobacter crystallopoietes			
	<400> 2			
	Met Ala Lys Asn Leu Met Leu Ala Val Ala Gln Val Gly Gly Ile Asp 1 5 10 15			
	Ser Ser Glu Ser Arg Pro Glu Val Val Ala Arg Leu Ile Ala Leu Leu 20 25 30			

Glu Glu Ala Ala Ser Gln Gly Ala Glu Leu Val Val Phe Pro Glu Leu  
                   35                                  40                                  45  
 5 Thr Leu Thr Thr Phe Phe Pro Arg Thr Trp Phe Glu Glu Gly Asp Phe  
           50                                  55                                  60  
 Glu Glu Tyr Phe Asp Lys Ser Met Pro Asn Asp Asp Val Ala Pro Leu  
   65                                  70                                  75                                  80  
 10 Phe Glu Arg Ala Lys Asp Leu Gly Val Gly Phe Tyr Leu Gly Tyr Ala  
                                   85                                  90                                  95  
 Glu Leu Thr Ser Asp Glu Lys Arg Tyr Asn Thr Ser Ile Leu Val Asn  
                                   100                                  105                                  110  
 15 Lys His Gly Asp Ile Val Gly Lys Tyr Arg Lys Met His Leu Pro Gly  
                                   115                                  120                                  125  
 20 His Ala Asp Asn Arg Glu Gly Leu Pro Asn Gln His Leu Glu Lys Lys  
                                   130                                  135                                  140  
 Tyr Phe Arg Glu Gly Asp Leu Gly Phe Gly Val Phe Asp Phe His Gly  
   145                                  150                                  155                                  160  
 25 Val Gln Val Gly Met Cys Leu Cys Asn Asp Arg Arg Trp Pro Glu Val  
                                   165                                  170                                  175  
 Tyr Arg Ser Leu Ala Leu Gln Gly Ala Glu Leu Val Val Leu Gly Tyr  
                                   180                                  185                                  190  
 30 Asn Thr Pro Asp Phe Val Pro Gly Trp Gln Glu Glu Pro His Ala Lys  
                                   195                                  200                                  205  
 35 Met Phe Thr His Leu Leu Ser Leu Gln Ala Gly Ala Tyr Gln Asn Ser  
                                   210                                  215                                  220  
 Val Phe Val Ala Ala Ala Gly Lys Ser Gly Phe Glu Asp Gly His His  
   225                                  230                                  235                                  240  
 40 Met Ile Gly Gly Ser Ala Val Ala Ala Pro Ser Gly Glu Ile Leu Ala  
                                   245                                  250                                  255  
 Lys Ala Ala Gly Glu Gly Asp Glu Val Val Val Val Lys Ala Asp Ile  
                                   260                                  265                                  270  
 45 Asp Met Gly Lys Pro Tyr Lys Glu Ser Val Phe Asp Phe Ala Ala His  
                                   275                                  280                                  285  
 50 Arg Arg Pro Asp Ala Tyr Gly Ile Ile Ala Glu Arg Lys Gly Arg Gly  
                                   290                                  295                                  300  
 Ala Pro Leu Pro Val Pro Phe Asn Val Asn Asp  
   305                                  310                                  315

55

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1404

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arthrobacter crystallopoietes

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1404)

5

&lt;400&gt; 3

atg gat gca aag cta ctg gtt ggc ggc act att gtt tcc tcg acc ggc 48  
 Met Asp Ala Lys Leu Leu Val Gly Gly Thr Ile Val Ser Ser Thr Gly  
 1 5 10 15

10

aaa atc cga gcc gac gtg ctg att gaa aac ggc aaa gtc gcc gct gtc 96  
 Lys Ile Arg Ala Asp Val Leu Ile Glu Asn Gly Lys Val Ala Ala Val  
 20 25 30

15

ggc atg ctg gac gcc gcg acg ccg gac aca gtt gag cgg gtt gac tgc 144  
 Gly Met Leu Asp Ala Ala Thr Pro Asp Thr Val Glu Arg Val Asp Cys  
 35 40 45

20

gac ggc aaa tac gtc atg ccc ggc ggt atc gac gtt cac acc cac atc 192  
 Asp Gly Lys Tyr Val Met Pro Gly Gly Ile Asp Val His Thr His Ile  
 50 55 60

25

gac tcc ccc ctc atg ggg acc acc acc gcc gat gat ttt gtc agc gga 240  
 Asp Ser Pro Leu Met Gly Thr Thr Thr Ala Asp Asp Phe Val Ser Gly  
 65 70 75 80

30

acg att gca gcc gct acc ggc gga aca acg acc atc gtc gat ttc gga 288  
 Thr Ile Ala Ala Ala Thr Gly Gly Thr Thr Thr Ile Val Asp Phe Gly  
 85 90 95

35

cag cag ctc gcc ggc aag aac ctg ctg gaa tcc gca gac gcg cac cac 336  
 Gln Gln Leu Ala Gly Lys Asn Leu Leu Glu Ser Ala Asp Ala His His  
 100 105 110

aaa aag gcg cag ggg aaa tcc gtc att gat tac ggc ttc cat atg tgc 384  
 Lys Lys Ala Gln Gly Lys Ser Val Ile Asp Tyr Gly Phe His Met Cys  
 115 120 125

40

gtg acg aac ctc tat gac aat ttc gat tcc cat atg gca gaa ctg aca 432  
 Val Thr Asn Leu Tyr Asp Asn Phe Asp Ser His Met Ala Glu Leu Thr  
 130 135 140

45

cag gac gga atc tcc agt ttc aag gtc ttc atg gcc tac cgc gga agc 480  
 Gln Asp Gly Ile Ser Ser Phe Lys Val Phe Met Ala Tyr Arg Gly Ser  
 145 150 155 160

50

ctg atg atc aac gac ggc gaa ctg ttc gac atc ctc aag gga gtc ggc 528  
 Leu Met Ile Asn Asp Gly Glu Leu Phe Asp Ile Leu Lys Gly Val Gly  
 165 170 175

tcc agc ggt gcc aaa cta tgc gtc cac gca gag aac ggc gac gtc atc 576  
 Ser Ser Gly Ala Lys Leu Cys Val His Ala Glu Asn Gly Asp Val Ile  
 180 185 190

55

gac agg atc gcc gcc gac ctc tac gcc caa gga aaa acc ggg ccc ggc 624  
 Asp Arg Ile Ala Ala Asp Leu Tyr Ala Gln Gly Lys Thr Gly Pro Gly  
 195 200 205

acc cac gag atc gca cgc ccg ccg gaa tcg gaa gtc gaa gca gtc agc 672

	Thr	His	Glu	Ile	Ala	Arg	Pro	Pro	Glu	Ser	Glu	Val	Glu	Ala	Val	Ser	
	210						215					220					
5	cgg	gcc	atc	aag	atc	tcc	cgg	atg	gcc	gag	gtg	ccg	ctg	tat	ttc	gtg	720
	Arg	Ala	Ile	Lys	Ile	Ser	Arg	Met	Ala	Glu	Val	Pro	Leu	Tyr	Phe	Val	
	225					230					235					240	
10	cat	ctt	tcc	acc	cag	ggg	gcc	gtc	gag	gaa	gta	gct	gcc	gcg	cag	atg	768
	His	Leu	Ser	Thr	Gln	Gly	Ala	Val	Glu	Glu	Val	Ala	Ala	Ala	Gln	Met	
					245					250					255		
15	aca	gga	tgg	cca	atc	agc	gcc	gaa	acg	tgc	acc	cac	tac	ctg	tcg	ctg	816
	Thr	Gly	Trp	Pro	Ile	Ser	Ala	Glu	Thr	Cys	Thr	His	Tyr	Leu	Ser	Leu	
				260					265					270			
20	agc	cgg	gac	atc	tac	gac	cag	ccg	gga	ttc	gag	ccg	gcc	aaa	gct	gtc	864
	Ser	Arg	Asp	Ile	Tyr	Asp	Gln	Pro	Gly	Phe	Glu	Pro	Ala	Lys	Ala	Val	
			275					280					285				
25	ctc	aca	cca	ccg	ctg	cgc	aca	cag	gaa	cac	cag	gac	gcg	ttg	tgg	aga	912
	Leu	Thr	Pro	Pro	Leu	Arg	Thr	Gln	Glu	His	Gln	Asp	Ala	Leu	Trp	Arg	
		290					295					300					
30	ggc	att	aac	acc	ggt	gcg	ctc	agc	gtc	gtc	agt	tcc	gac	cac	tgc	ccc	960
	Gly	Ile	Asn	Thr	Gly	Ala	Leu	Ser	Val	Val	Ser	Ser	Asp	His	Cys	Pro	
	305					310					315					320	
35	ttc	tgc	ttt	gag	gaa	aag	cag	cgg	atg	ggg	gca	gat	gac	ttc	cgg	cag	1008
	Phe	Cys	Phe	Glu	Glu	Lys	Gln	Arg	Met	Gly	Ala	Asp	Asp	Phe	Arg	Gln	
				325						330					335		
40	atc	ccc	aac	ggc	ggg	ccc	ggc	gtg	gag	cac	cga	atg	ctc	gtg	atg	tat	1056
	Ile	Pro	Asn	Gly	Gly	Pro	Gly	Val	Glu	His	Arg	Met	Leu	Val	Met	Tyr	
				340				345						350			
45	gag	acc	ggt	gtc	gcg	gaa	gga	aaa	atg	acg	atc	gag	aaa	ttc	gtc	gag	1104
	Glu	Thr	Gly	Val	Ala	Glu	Gly	Lys	Met	Thr	Ile	Glu	Lys	Phe	Val	Glu	
			355				360					365					
50	gtg	act	gcc	gag	aac	ccg	gcc	aag	caa	ttc	gat	atg	tac	ccg	aaa	aag	1152
	Val	Thr	Ala	Glu	Asn	Pro	Ala	Lys	Gln	Phe	Asp	Met	Tyr	Pro	Lys	Lys	
		370					375					380					
55	gga	aca	att	gca	ccg	ggc	tcc	gat	gca	gac	atc	atc	gtg	gtc	gac	ccc	1200
	Gly	Thr	Ile	Ala	Pro	Gly	Ser	Asp	Ala	Asp	Ile	Ile	Val	Val	Asp	Pro	
	385					390					395					400	
50	aac	gga	aca	acc	ctc	atc	agt	gcc	gac	acc	caa	aaa	caa	aac	atg	gac	1248
	Asn	Gly	Thr	Thr	Leu	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Gln	Lys	Gln	Asn	Met	Asp	
					405					410					415		
55	tac	acg	ctg	ttc	gaa	ggc	ttc	aaa	atc	cgt	tgc	tcc	atc	gac	cag	gtg	1296
	Tyr	Thr	Leu	Phe	Glu	Gly	Phe	Lys	Ile	Arg	Cys	Ser	Ile	Asp	Gln	Val	
				420				425						430			
55	ttc	tcg	cgt	ggc	gac	ctg	atc	agc	gtc	aaa	ggc	gaa	tat	gtc	ggc	acc	1344
	Phe	Ser	Arg	Gly	Asp	Leu	Ile	Ser	Val	Lys	Gly	Glu	Tyr	Val	Gly	Thr	
			435					440					445				



cgc ggc cgc ggc gaa ttc atc aag cgg agc gct tgg agc cac ccg cag 1392  
 Arg Gly Arg Gly Glu Phe Ile Lys Arg Ser Ala Trp Ser His Pro Gln  
 450 455 460

5 ttc gaa aaa taa 1404  
 Phe Glu Lys  
 465

10 <210> 4  
 <211> 468  
 <212> PRT  
 <213> *Arthrobacter crystallopoietes*

15 <400> 4  
 Met Asp Ala Lys Leu Leu Val Gly Gly Thr Ile Val Ser Ser Thr Gly  
 1 5 10 15

20 Lys Ile Arg Ala Asp Val Leu Ile Glu Asn Gly Lys Val Ala Ala Val  
 20 25 30

Gly Met Leu Asp Ala Ala Thr Pro Asp Thr Val Glu Arg Val Asp Cys  
 35 40 45

25 Asp Gly Lys Tyr Val Met Pro Gly Gly Ile Asp Val His Thr His Ile  
 50 55 60

Asp Ser Pro Leu Met Gly Thr Thr Thr Ala Asp Asp Phe Val Ser Gly  
 65 70 75 80

30 Thr Ile Ala Ala Ala Thr Gly Gly Thr Thr Thr Ile Val Asp Phe Gly  
 85 90 95

35 Gln Gln Leu Ala Gly Lys Asn Leu Leu Glu Ser Ala Asp Ala His His  
 100 105 110

Lys Lys Ala Gln Gly Lys Ser Val Ile Asp Tyr Gly Phe His Met Cys  
 115 120 125

40 Val Thr Asn Leu Tyr Asp Asn Phe Asp Ser His Met Ala Glu Leu Thr  
 130 135 140

Gln Asp Gly Ile Ser Ser Phe Lys Val Phe Met Ala Tyr Arg Gly Ser  
 145 150 155 160

45 Leu Met Ile Asn Asp Gly Glu Leu Phe Asp Ile Leu Lys Gly Val Gly  
 165 170 175

50 Ser Ser Gly Ala Lys Leu Cys Val His Ala Glu Asn Gly Asp Val Ile  
 180 185 190

Asp Arg Ile Ala Ala Asp Leu Tyr Ala Gln Gly Lys Thr Gly Pro Gly  
 195 200 205

55 Thr His Glu Ile Ala Arg Pro Pro Glu Ser Glu Val Glu Ala Val Ser  
 210 215 220

Arg Ala Ile Lys Ile Ser Arg Met Ala Glu Val Pro Leu Tyr Phe Val  
 225 230 235 240

His Leu Ser Thr Gln Gly Ala Val Glu Glu Val Ala Ala Ala Gln Met  
 245 250 255  
 5 Thr Gly Trp Pro Ile Ser Ala Glu Thr Cys Thr His Tyr Leu Ser Leu  
 260 265 270  
 Ser Arg Asp Ile Tyr Asp Gln Pro Gly Phe Glu Pro Ala Lys Ala Val  
 275 280 285  
 10 Leu Thr Pro Pro Leu Arg Thr Gln Glu His Gln Asp Ala Leu Trp Arg  
 290 295 300  
 Gly Ile Asn Thr Gly Ala Leu Ser Val Val Ser Ser Asp His Cys Pro  
 305 310 315 320  
 Phe Cys Phe Glu Glu Lys Gln Arg Met Gly Ala Asp Asp Phe Arg Gln  
 325 330 335  
 20 Ile Pro Asn Gly Gly Pro Gly Val Glu His Arg Met Leu Val Met Tyr  
 340 345 350  
 Glu Thr Gly Val Ala Glu Gly Lys Met Thr Ile Glu Lys Phe Val Glu  
 355 360 365  
 25 Val Thr Ala Glu Asn Pro Ala Lys Gln Phe Asp Met Tyr Pro Lys Lys  
 370 375 380  
 Gly Thr Ile Ala Pro Gly Ser Asp Ala Asp Ile Ile Val Val Asp Pro  
 385 390 395 400  
 Asn Gly Thr Thr Leu Ile Ser Ala Asp Thr Gln Lys Gln Asn Met Asp  
 405 410 415  
 35 Tyr Thr Leu Phe Glu Gly Phe Lys Ile Arg Cys Ser Ile Asp Gln Val  
 420 425 430  
 Phe Ser Arg Gly Asp Leu Ile Ser Val Lys Gly Glu Tyr Val Gly Thr  
 435 440 445  
 40 Arg Gly Arg Gly Glu Phe Ile Lys Arg Ser Ala Trp Ser His Pro Gln  
 450 455 460  
 Phe Glu Lys  
 45 465  
 <210> 5  
 <211> 70  
 50 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer 1  
 55 <400> 5  
 aaccagtgcc gcgaatgccg ggcaaatctc ccccgatat gctgcaccgt attccgggga 60  
 tccgtcgacc

5 <210> 6  
<211> 60  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

10 <220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer 2  
<400> 6  
aggggtaccg gtaggcgcgt ggcgcggata accgtcgcg attccgggga tccgtcgacc 60

15 <210> 7  
<211> 70  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

20 <220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer 3  
<400> 7  
gcgggcacat tcctgctgtc atttatcatc taagcgcaaa gagacgtact gtgtaggctg 60

25 gagctgcttc 70

30 <210> 8  
<211> 70  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

35 <220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer 4  
<400> 8  
gcagcatcgc tcacccaggg aaaggattgc gatgctgcgt tgaaacgtta atggaatta 60

40 gccatggtcc 70

## Beispiele

Beispiel 1: Produktion von D-Aminosäuren mittels rekombinanten *E.coli* Zellen

Chemisch kompetente *E.coli* JM109 (Promega) wurden mit  
5 pJAVI16 (siehe Abb. 3) transformiert. Dieses Plasmid trägt eine D-Carbamoylase und eine D-Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM20117. Die Sequenzen der D-Hydantoinase und D-Carbamoylase sind in Seq. 1 und 3 dargestellt (siehe auch DE10114999.9 bzw. DE10130169.3)

10 Die mit pJAVIER16 transformierten *E.coli* Zellen wurden auf LBamp-Platten (Ampicillinkonzentration: 100µg/ml) vereinzelt. 2,5 ml LBamp-Medium mit 1mM ZnCl<sub>2</sub> wurden mit einer einzelnen Kolonie beimpft und 30 Stunden bei 37°C und 250rpm inkubiert. Diese Kultur wurde in 100ml LBamp-Medium  
15 mit 1mM ZnCl<sub>2</sub> und 2g/l Rhamnose 1:50 verdünnt und 18h bei 30°C inkubiert. Die Kultur wurde 10 min bei 10000g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Biomasse gewogen. Die Biomasse wurde mit unterschiedlichen Hydantoinderivaten, z.B. 100mM DL-Hydroxymethylhydantoin  
20 bzw. DL-Ethylhydantoin, pH 7.5, versetzt, so dass sich eine Biomassenkonzentration von 40g Biofeuchtmasse pro Liter ergibt. Die Reaktionslösung wurde bei 37°C inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeiten wurden Proben genommen, zentrifugiert und die entstandenen Aminosäuren mittels HPLC  
25 quantifiziert.

Beispiel 2: Erzeugung DsdA und DadA defizienten *E.coli* Stämmen

DadA wurde in *E.coli* BW25113 (Bei CGSC unter der Nummer  
30 CGSC7636 hinterlegt) gemäß der von Datsenko & Wanner beschriebenen Methode deletiert (One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, Datsenko, Kirill A. and Wanner, Barry L. PNAS

(2000), 97(12), 6640-6645). Hierzu wurden folgende Primer zur Amplifikation der Chloramphenicolresistenz aus pKD13 (Bei CGSC unter der Nummer CGSC7633 hinterlegt) verwendet:

5' \_AACCAGTGCCGCGAATGCCGGGCAAATCTCCCCCGGATATGCTGCACCGTATTCCG  
5 GGGATCCGTCGACC\_3' : Seq. 5

5' \_AGGGGTACCGGTAGGCGCGTGGCGCGGATAACCGTCGGCGATTCCGGGG

ATCCGTCGACC-3' : Seq. 6

Eine Transformation des Amplifikats in *E.coli* BW25113 (pKD46) (hinterlegt bei CGSC unter der Nummer CGSC7630) und Selektion kanamycinresistenter Klone ermöglichte die Isolierung von *E.coli* ET2. Nach Entfernung der Chloramphenicolresistenz gemäß des Protokolls von Datsenko & Wanner konnte der Stamm *E.coli* ET3 isoliert werden. Zur Deletion von *dsdA* in *E.coli* ET3 wurde wiederum die Chloramphenicolresistenz aus pKD13 mit folgenden Primern amplifiziert:

5' \_GCGGGCACATTCCTGCTGTCATTTATCATCTAAGCGCAAAGAGACGTACTGTGTAG  
GCTGGAGCTGCTTC\_3' : Seq. 7

5' \_GCAGCATCGCTCACCCAGGGAAAGGATTGCGATGCTGCGTTGAAACGTTAATGGGA  
20 ATTAGCCATGGTCC\_3' : Seq. 8

Eine Transformation des Amplifikats in *E.coli* ET3 (pKD46) und Selektion kanamycinresistenter Klone ermöglichte die Isolierung von *E.coli* ET4, welcher sowohl ein Deletion in *dadA* als auch in *dsdA* trägt.

### Beispiel 3 Untersuchung des Abbaus von D-Aminosäuren

2,5 ml LB-Medium wurden mit einer einzelnen Kolonie von *E.coli* BW25113, *E.coli* ET3 und *E.coli* ET4 beimpft und 18 Stunden bei 37°C und 250rpm inkubiert. Diese Kulturen wurden in 100ml LB-Medium 1:50 verdünnt und 18h bei 37°C

inkubiert. Die Kulturen wurden 10 min bei 10000g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Biomasse gewogen. Die Biomasse wurde mit unterschiedlichen 100mM D-Aminosäurelösungen, pH7,5 (z.B. D-Methionin, D-  
5 Phenylalanin, D-Aminobuttersäure, D-Serin) so versetzt, dass sich eine Biomassenkonzentration von 100g Biofeuchtmasse pro Liter ergibt. Diese Reaktionslösungen wurden bei 37°C inkubiert und nach 10 Stunden  
10 zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mittels HPLC auf die verbleibende Aminosäurekonzentration untersucht. Die Angabe %Abbau wurde aus dem Quotienten der Anfangskonzentration und Endkonzentration nach 10 Stunden Inkubation berechnet.

**Patentansprüche:**

1. Rekombinanter Mikroorganismus zur Herstellung von D-Aminosäuren ausgehend von N-Carbamoylaminosäuren oder 5-monosubstituierten Hydantoinen bei dem durch  
5 Mutagenese das Gen kodierend für eine D-Aminosäureoxidase und/oder das Gen kodierend für eine D-Serindehydratase inaktiviert ist.
2. Mikroorganismus nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
10 es sich um einen Organismus der Gattung *Escherichia coli* handelt.
3. Mikroorganismus nach Anspruch 1 und/oder 2,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
dieser ein D-Carbamoylasegen aus *Agrobacterium sp.*,  
15 *Arthrobacter sp.* oder *Bacillus sp.* besitzt.
4. *Escherichia coli* DSM 15181 und daraus abgeleitete Mutanten.
5. *Escherichia coli* DSM 15182 und daraus abgeleitete Mutanten.
- 20 6. Verfahren zur Herstellung von D-Aminosäuren mit einem Mikroorganismus nach Anspruch 1-5.
7. Verfahren nach Anspruch 6,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
man D-Aminobuttersäure, D-Serin, D-Methionin, D-  
25 Tryptophan und D-Phenylalanin herstellt.

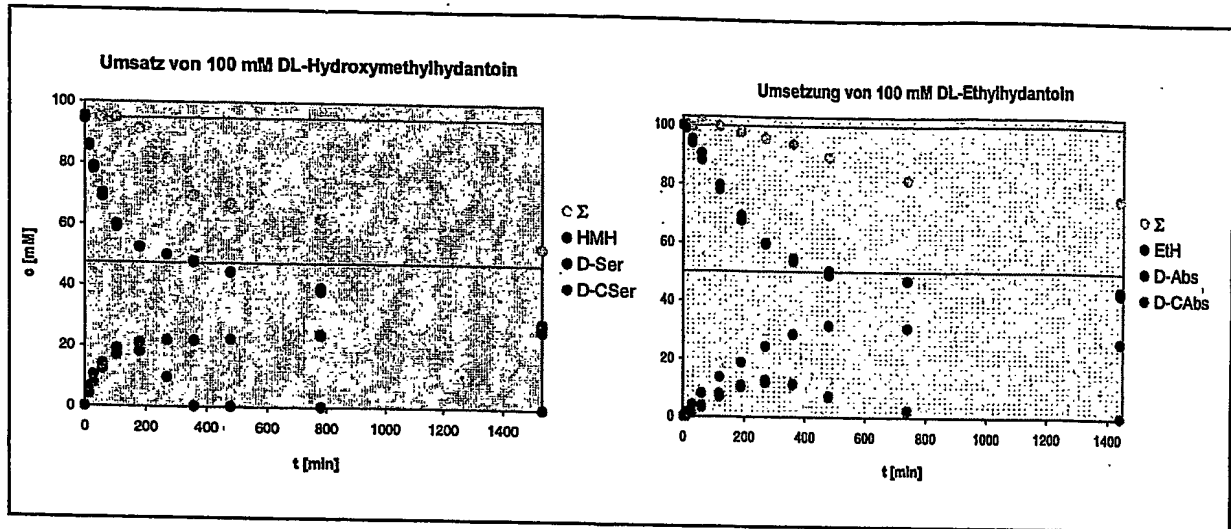
Zusammenfassung:

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf spezielle E. coli Mutanten, die für die Synthese von D-Aminosäuren verwendet werden können sowie auf ein solches Verfahren.

- 5 die Mutanten zeichnen sich durch Defizienzen in bestimmten D-aminosäureabbauenden Enzymen aus.



Fig. 1:



10 Fig. 2

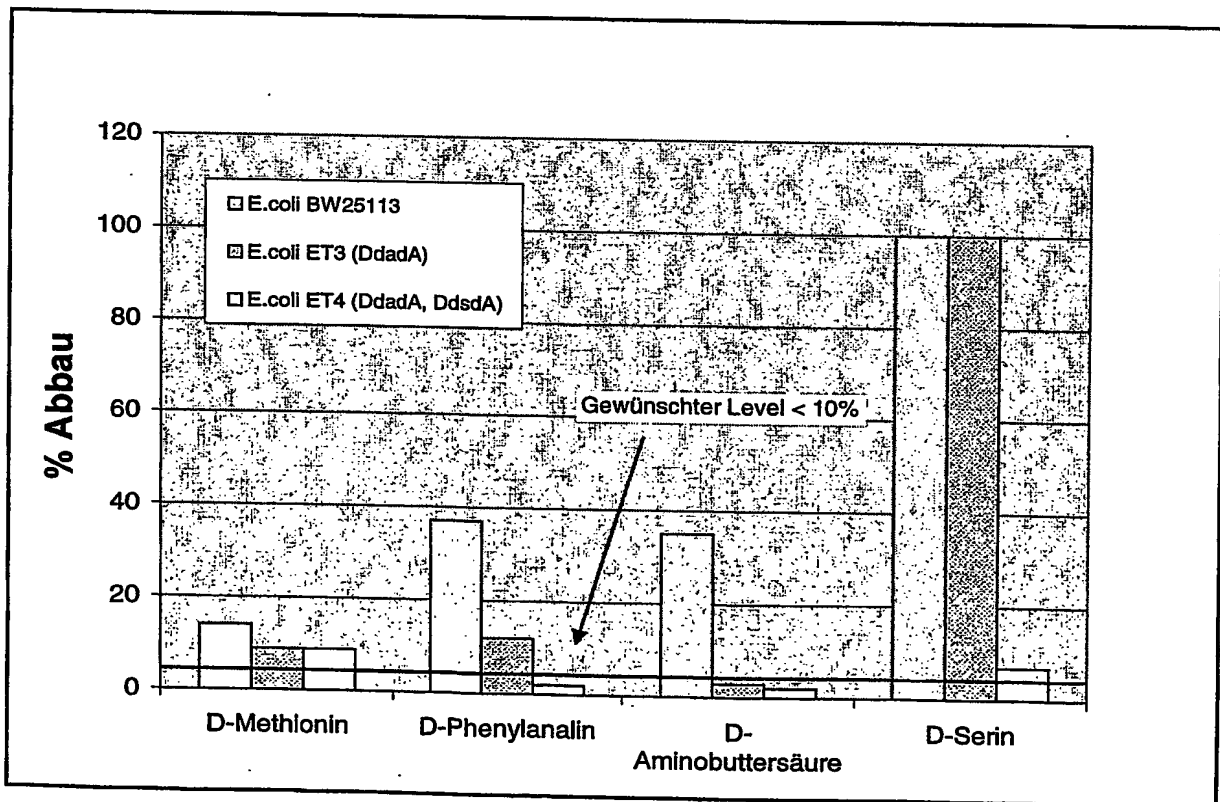


Fig. 3

